VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender:

MIT DER INT ATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Wehlan, Helmut Paul-Gesche-Str. 1 D-10315 BERLIN ALLEMAGNE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr)

05.12.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

9961

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) Pr

27/08/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

WICHTIGE MITTEILUNG

28/08/1998

Anmelder

KOEHLER, Thomas

PCT/DE99/02715

Internationales Aktenzeichen

- 1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- 2. Eine Kopie des Berichts wird gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- 3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

Europäisches Patentamt

Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 4465

D-80298 München

Bevollmächtigter Bediensteter

Danti, B

Tel. +49 89 2399-8161



PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

	(Artikel 36 und h			
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEH	siehe Mittell EN vorläufigen	ung über die Übersendung des Prüfungsbericht (Formblatt PC	internationalen Г/IPĖA/416)
9961	Internationales Anmeldedatu	m/Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/T	ag)
Internationales Aktenzeichen		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	28/08/1998	
PCT/DE99/02715	27/08/1999		20.00.100	
Internationale Patentidassification (IPK) ode C12Q1/68	er nationale Klassifikation und IP	K		<i></i>
Anmelder				·
KOEHLER, Thomas			D	
Dieser internationale vorläufige P Behörde erstellt und wird dem An	rüfungsbericht wurde von de imelder gemäß Artikel 36 üb	er mit der internati ermittelt.	onale vorläutigen Prutung t	eaumagte
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesa	mt 8 Blätter einschließlich d	lieses Deckblatts.		
Außerdem liegen dem Berich und/oder Zeichnungen, die g Behörde vorgenommenen B	nt ANLAGEN bei; dabei han	delt es sich um Bl	ätter mit Beschreibungen, A	nsprüchen it vor dieser Ilinien zum PCT).
tinage	omt 3 Blätter	•		t^{I}
Diese Anlagen umfassen insges	ann o bianer.			
3. Dieser Bericht enthält Angaben	zu folgenden Punkten:			
I ⊠ Grundlage des Berid	chts			٠,
1			may and tipho An	vondbarkeit
III	es Gutachtens über Neuhei	t, erfinderische Tä	itigkeit und geweibliche An	Wellabarkok
	Ableat dar Erfindung			
∨ ⊠ Begründete Festste gewerbliche Anwen	llung nach Artikel 35(2) hins dbarkeit; Unterlagen und Erl	ichtlich der Neuhe klärungen zur Stü	tzung dieser Feststellung	in unu doi
VI 🛛 Bestimmte angefüh	rte Unterlagen		i.	
VII Bestimmte Mängel	der internationalen Anmeldu	ng	•	
VIII Bestimmte Bemerk	ungen zur internationalen Ar	nmeldung		
Datum der Einreichung des Antrags		Datum der Fertigste	ellung dieses Berichts	
Datum der Emilionang des Firmsgr				
27/03/2000		05.12.2000		
27/03/2000				
Name und Postanschrift der mit der inter Prüfung beauftragten Behörde:	nationalen vorläufigen	Bevollmächtigter B	ediensteter	STATE OF MENTERS
Europäisches Patentamt	,	BROCHADO G	ARGANTA, M	
D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 52	23656 epmu d	BUOCUMDO C		Sed norm to see you
Fax: +49 89 2399 - 4465		Tel. Nr. +49 89 239	99 8935	

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02715

l. Grundlage o	ies i	Beri	chts
----------------	-------	------	------

l.	Gr	rundlage des Berichts					
1.	Art.	ikel 14 hin vorgeleg	erstellt auf der Grundlage (<i>Ersa</i> It wurden, gelten im Rahmen d ie keine Änderungen enthalten. n:	ieses Berichts			
	1-1	8	ursprüngliche Fassung				
	Pat	entansprüche, Nr.	. .				
	1-1	6	eingegangen am	08/09/2000	mit Schreiben vom	07/09/2000	
	Zei	chnungen, Blätter	· :			. •	
	1/4	-4/4	ursprüngliche Fassung				
				,			
2.	die	internationale Anm	he: Alle vorstehend genannten eldung eingereicht worden ist, chts anderes angegeben ist.				
		Bestandteile stand ei handelt es sich ι	len Behörde in der Sprache: , z um	ur Verfügung t	ozw. wurden in dieser	Sprache eingereicht;	
		die Sprache der Ü Regel 23.1(b)).	bersetzung, die für die Zwecke	der internatio	nalen Recherche einç	gereicht worden ist (nac	
		die Veröffentlichur	ngssprache der internationalen	Anmeldung (n	ach Regel 48.3(b)).	. '	
		die Sprache der Ü ist (nach Regel 55	lbersetzung, die für die Zwecke 6.2 und/oder 55.3).	der internatio	nalen vorläufigen Prü	fung eingereicht worde	
3.			internationalen Anmeldung offe Je Prüfung auf der Grundlage d				
		in der international	len Anmeldung in schriftlicher I	orm enthalten	ist.		
		zusammen mit der	r internationalen Anmeldung in	computerlesb	arer Form eingereicht	worden ist.	
		bei der Behörde na	achträglich in schriftlicher Form	eingereicht w	orden ist.		
		bei der Behörde na	achträglich in computerlesbare	r Form eingere	eicht worden ist.		
			ss das nachträglich eingereicht alt der internationalen Anmeldu				
		•	ss die in computerlesbarer Forr entsprechen, wurde vorgelegt.		ormationen dem schri	iftlichen	

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02715

		Beschreibung, Ansprüche, Zeichnungen,	Seiten: Nr.: Blatt:			
5.			en nach Auffassu	ng der Behör	en) der Änderungen erstellt worden, da diese de über den Offenbarungsgehalt in der urspr).	
	٠.	(Auf Ersatzblätter, die beizufügen).	e solche Änderun	gen enthalter	n, ist unter Punkt 1 hinzuweisen;sie sind diese	em Bericht
6.	Etwa	aige zusätzliche Bemo	erkungen:			
V.	_				ch der Neuheit, der erfinderischen Tätigke ungen zur Stützung dieser Feststellung	eit und der
1.	Fest	stellung				
	Neu	heit (N)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-16	
	Erfin	nderische Tätigkeit (E	•	Ansprüche Ansprüche	5, 10 1-4, 6-9, 11-16	;,

Ansprüche

Nein: Ansprüche

Ja:

1-16

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken: siehe Beiblatt



Zu Punkt V

7

J.

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
 - Day I N M et al.: Biotechniques, Bd. 18, Nr. 6, 1995, Seiten 981-984-984
 - EP-A-0 726 310 (B)
 - FR-A-2 674 253
 - Stratagene Catalogue, Seiten 274-277
 - Sambrook J. et al.: 'Molecular cloning' 1987 (E)
- 2. Die am 08.09.2000 eingereichten Änderungen bringen keine Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34(2)(b) PCT über den Offenbarungsgehalt der Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen.
- 3. Neuheit
- Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT, da die beanspruchten mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume nicht im Stand der Technik offenbart sind.
- 3.2 Aus dem gleichen Grund ist der Gegenstand der abhängigen Ansprüche 2, 3 und 5 auch neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT.
- 3.3 Das Verfahren zur Herstellung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume (Anspruch 6 der vorliegenden Anmeldung) und die Verwendung der beanspruchten Reaktionsräume zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäure in biologischen

1



Substanzen (Anspruch 15 der vorliegenden Anmeldung) sind auch neu (Artikel 33(2) PCT). Das gleiche gilt für die abhängigen Ansprüche 7, 8, 10-14 und 16.

- 4. Erfinderische Tätigkeit
- Dokument A offenbart die Anwendung von mit DNA beschichteten Gefäßen, wobei die Beschichtung mit zu untersuchenden DNA-Proben erfolgt (siehe Seiten 982 and 983, "Dried template DNA" and "Dried PCR oligonucleotides"). Nach Trocknung haften die adsorbierten DNA-Moleküle an der Innenseite des zur Beschichtung verwendeten Reaktionsraumes (siehe Seite 983).

Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich von der Offenbarung in Dokument A durch die Anwendung von Standard-Nukleinsäuren.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, daß eine quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren mit diesen Reaktionsräumen ermöglicht wird.

Es handelt sich dabei nur um eine naheliegende Möglichkeit (Verwendung von definierten Mengen Standard-DNA), aus denen der Fachmann ohne erfinderisches Zutun den Umständen entsprechend auswählen würde, um die gestellte Aufgabe zu lösen.

Anspruch 1 beruht daher nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

4.2 Die abhängigen Ansprüche 2-4 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen des Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit erfüllen.

Beim Gegenstand der Ansprüche 2 und 3 handelt es sich nur um mehrere naheliegenden Möglichkeiten, aus denen der Fachmann ohne erfinderisches Zutun den Umständen entsprechend auswählen würde.

Der Fachmann würde es als übliche Vorgehensweise ansehen, Lambda-DNA oder tRNA-Lösung zur Verdünnung von DNA- und RNA-Standards zu verwenden. Der Gegenstand des Anspruchs 4 beruht somit nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit und erfüllt damit nicht das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium.

- 4.3 Die Verwendung von physikalisch mittels Ultraschall in kleinere Fragmente überführte Lambda-DNA wurde noch nicht beschrieben. Diese kleine Fragmente fungieren als Adsorpsionsvermittler und Stabilisatoren. Sie können sich während der PCR-üblichen initialen Denaturierung komplett lösen und somit gewährleisten, daß auch die Standard-Moleküle komplett von der Innenwandung des Reaktionsraumes desorbieren. Daher beruht Anspruch 5 auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).
- 4.4 Aus dem gleichen Grund (siehe 4.1 und 4.2) beruht der Gegenstand der Ansprüche6-9 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

Anspruch 10 scheint auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen (siehe 4.3).

4.5 Ansprüche 11-16 beruhen nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

Die Merkmale der abhängigen Ansprüche 12-14 wurden schon für denselben Zweck bei einem ähnlichen Verfahren benutzt, vgl. dazu Dokument A, Seite 981. Für den Fachmann war es daher naheliegend zu den Merkmalen der Ansprüche 12-14 zu gelangen.

Die abhängigen Ansprüche 11 und 15-16 betreffen geringfügige bauliche Änderungen des Verfahrens und Anwendungen dieser Reaktionsräume, die im Rahmen dessen liegt, was ein Fachmann aufgrund der ihm geläufigen Überlegungen zu tun pflegt. Folglich liegt auch dem Gegenstand der Ansprüche 11 und 15-16 keine erfinderische Tätigkeit zugrunde.

5. Folgende Bemerkungen sind jedoch zu berücksichtigen:

Nach Angabe der vorliegenden Erfindung bewirken Träger-Nukleinsäure eine verbesserte Adsorption während der Lyophilisationsprozesses und führen zu erhöhter Haltbarkeit der Standard-Nukleinsäure im Reaktionsraum. Jedoch ist der Begriff "Träger-Nukleinsäure" nicht in den Ansprüchen weiter definiert. Unter diesem

4

Begriff könnte eine Reihe von verschiedenen Nukleinsäure-Lösungen verstanden werden.

Durch die breite Formulierung der beanspruchten Reaktionsräume können alle Gefäße mit einer DNA-Lösung in den nicht genau definierten Schutzbereich des Anspruchs 1 aufgenommen werden.

6. Die folgenden im Recherchenbericht angegebenen Dokumente sind nicht neuheitsschädlich für die vorliegenden Ansprüche aus folgenden Gründen heraus:

Dokumente B offenbart die Herstellung stabiler lyophilisierten Enzymkompositionen, die bei der PCR benutzt werden können. Dabei werden aber die Nukleinsäure erst nach der Lyophilisation beigefügt. Die Beschichtung der Gefäße erfolgt im Gegensatz zur erfindungsgemäßen Beschichtung nicht mit Nukleinsäuren. Das gleiche gilt für Dokument C. Dokument D und E beziehen sich auf die Synthese und Isolierung von Oligonukleotiden, und haben in Gemeinsam mit der vorliegenden Erfindung nur die Durchführung eines Lyophilisationsprozesses.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Die Anmeldung beansprucht zu Recht das Prioritäts-Datum vom 28.08.1998. Das im Recherchenbericht als Zwischenliteratur angegebene Dokument (DE 197 16 154 A) ist eine nationale Deutscher-Anmeldung, die am 22. Oktober 1998 veröffentlicht wurde. Ihr Inhalt gilt daher nicht als Stand der Technik und wird nicht bei der Prüfung auf Neuheit oder erfinderische Tätigkeit berücksichtigt.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1.1 In Anspruch 1 wird die Erfindung durch das zu erreichende Ergebnis angegeben (die Beschichtung mit Nukleinsäuren). Somit ist der Gegenstand des Anspruchs 1 unklar

(Artikel 6 PCT).

1.2 Die breite Formulierung in Anspruch 1 führt zur Unklarheit des Anspruchs hinsichtlich dem Schutzumfang (Artikel 6 PCT). Alle Gefäße mit einer DNA-Lösung können in den nicht genau definierten Schutzbereich des Anspruchs 1 aufgenommen werden.

Euro GD1	ppälsches Patentamt - Dienststelle Berlin
	0 8. SEP. 2000
Anl.:	

Patentansprüche

- 1. Mit nativen, synthetisch oder enzymatisch hergestellten Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung mit kalibrierten Standard-Nukleinsäuren unter Zusatz von Träger-Nukleinsäure auf nicht-kovalentem Wege an chemisch oder biochemisch nicht-modifizierte Oberflächen der Innenwandung von Reaktionsräumen erfolgt.
- 2. Reaktionsräume nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass diese aus Glas- oder Plastik-Gefäßen oder aus Glaskapillaren bestehen.
- 3. Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard-Nukleinsäuren DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA sowie dU-haltige DNA eingesetzt werden.
- 4. Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass
- a) zur Verdünnung von DNA-Standards eine DNA-Lösung eingesetzt wird, welche eine minimale Sequenzhomologie zu dem zu analysierenden Nukleinsäuregemisch aufweist
- b) zur Verdünnung von RNA-Standards eine tRNA-Lösung verwendet wird.
- 5. Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Träger-Nukleinsäure DNA des Lambda-Phagen verwendet wird, welche zuvor mittels Ultraschall-Behandlung in leicht desorbierbare Fragmente einer mittleren Länge von ca. 1-2 kb überführt wird.
- 6. Verfahren zur Herstellung der Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass kalibrierte Standard-Nukleinsäuren und zugesetzte Träger-Nukleinsäure direkt in zur enzymatischen Amplifikation geeignete Reaktionsräume aliquotiert werden und anschließend nicht-kovalent direkt an die Innenwandung des Reaktionsraumes durch Lyophilisierung mittels Gefriertrocknung oder Vakuum-Zentrifugation adsorbiert werden.
- 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass Plastik-Gefäße bzw. Glaskapillaren beschichtet werden.

- 8. Verfahren nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Nukleinsäuren DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA sowie dU-haltige DNA eingesetzt werden.
- 9. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass
- a) zur Verdünnung von DNA-Standards eine DNA-eingesetzt wird, welche eine minimale Sequenzhomologie zu dem zu analysierenden Nukleinsäuregemisch aufweist und
- b) zur Verdünnung von RNA-Standards eine tRNA-Lösung verwendet wird.

ĺ

(

- 10. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Träger-Nukleinsäure DNA des Lambda-Phagen verwendet wird, welche zuvor mittels Ultraschall-Behandlung in leicht desorbierbare Fragmente einer mittleren Länge von ca. 1-2 kb überführt wird.
- 11. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass entsprechende Reaktionsräume simultan mit einer Vielzahl (mindestens 2) diverser, Analytsequenzspezifischer, kalibrierter Nukleinsäuren, ggf. unterschiedlichem zellulären oder organischen Ursprungs bzw. aus verschiedenen Spezies stammend, beschichtet werden.
- 12. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung von mindestens 96, im Mikrotiterplatten-Format angeordneten Reaktionsräumen mit mindestens 12 x 8 sequenzspezifischen Standard-Nukleinsäuren abnehmenden, den gesamten erwarteten Konzentrationsbereich der zu messenden Analytnukleinsäure erfassenden Konzentrationen (höchste Konzentration: A1-12, niedrigste Konzentration: H1-12) erfolgt.
- 13. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die beschichteten Reaktionsräume aufrecht stehend in einer geeigneten, mindestens 96 Gefäße aufnehmenden Träger-Box verschlossen werden.
- 14. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 13, wobei in den Reaktionsräumen neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens zwei spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die

Q

enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten sind oder spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in separaten Gefäßen ohne Nukleinsäure-Standard in lyophilisierter Form enthalten sind.

- 15. Verwendung von mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräumen nach den Ansprüchen1 bis 14 in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.
- 16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Testkits aus mindestens einem mit Folie verschlossenen ZeptoStrip (8-er Strip aus verschlossenen, mit 8 verschiedenen Nukleinsäure-Konzentrationen beschichteten Reaktionsräumen), mindestens zwei Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure bestehen.



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGEN INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation /:		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/12750
C12Q 1/68	A2	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE (22) Internationales Anmeldedatum: 27. August 1999 (23)		BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU
(30) Prioritätsdaten: 198 40 531.6 28. August 1998 (28.08.98)	I	Veröffentlicht E Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
(71)(72) Anmelder und Erfinder: KOEHLER, Thomas Am langen Feld 14, D-04451 Borsdorf (DE).	(DE/DI	l;
(74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, Berlin (DE).	D-103	5
(54) TEAL. DE ACTION CHAMPERS COATED WITH I	DEEDI	ED CONCENTE ATIONS OF MUCHEIC ACIDS METHOD FOR TH

- (54) Title: REACTION CHAMBERS COATED WITH DEFINED CONCENTRATIONS OF NUCLEIC A PRODUCTION AND USE THEREOF
- (54) Bezeichnung: MIT NUKLEINSÄUREN BESCHICHTETE REAKTIONSRÄUME, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract

Reaction chambers with defined concentrations of nucleic acids and method for coating the reaction chambers used in order to standardize quantitative enzymatic detection methods, characterized in that the concentration of nucleic acids used are determined in an exact manner. A series of dilutions encompassing the expected measuring range is produced using a carrier nucleic acid that is physically transformed in relatively small fragments, whereby aliquots of said nucleic acid dilutions undergo mild drying in reaction chambers that are suitable for enzymatic amplifications, whereby eight different concentrations of respectively lyophilized standard nucleic acids are indicated in the form of a "ZeptoStrip". The invention also relates to a test kit in which the inventive method is used.

(57) Zusammenfassung

Reaktionsräume mit definierten Konzentrationen von Nukleinsäuren, Verfahren zur Beschichtung der Reaktionsräume, die zur Standardisierung quantitativer enzymatischer Nachweisverfahren dienen, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der verwendeten Nukleinsäuren exakt ermittelt wird, hiervon eine den erwarteten Messbereich erfassende Verdünnungsreihe unter Verwendung einer physikalisch in kleinere Fragmente überführten Träger-Nukleinsäure hergestellt wird, wobei Aliquote dieser Nukleinsäure-Verdünnungen in für enzymatische Amplifizierungen geeigneten Reaktionsräumen einer schonenden Trocknung unterworfen werden, wobei 8 verschiedene Konzentrationen der jeweils lyophilisierten Standard-Nukleinsäure als "ZeptoStrip" bezeichnet werden und Testkit, in dem das erfindungsgemässe Verfahren Anwendung findet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	ΙT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JР	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
Cī	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	rc	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

15

25

30

35

Die Erfindung betrifft mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsgefäße, Verfahren zu ihrer Herstellung durch die Beschichtung der Gefäße mit Standard-Nukleinsäuren, einen Testkit, enthaltend einen Standard-Strip, hergestellt unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, einen Satz von mindestens 2 Oligonukleotiden, die hierfür geeignet sind, einer Träger-Nukleinsäure sowie eine Vielzahl von Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens für den quantitativen Nachweis ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.

Viele Bereiche in der klinischen Forschung und Diagnostik, der pharmakologischen Wirkstoffprüfung sowie der Lebensmittelanalytik machen es erforderlich, Konzentrationen bestimmter Nukleinsäuren (Desoxyribonukleinsäure [DNA]- oder Ribonukleinsäure [RNA]) in einer zu analysierenden Probe genau zu kennen. Zur Messung insbesondere extrem geringer Analytkonzentrationen kommen häufig enzymatische Amplifizierungsverfahren zum Einsatz. Hierbei handelt es sich u.a. um die Verfahren Polymerasekettenreaktion (PCR, US Patente 4.683.195, 4.683.202, EP 0 200 362, EP 0 201 184; Hoffmann-La Roche), Ligasekettenreaktion (LCR, Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA), Strand Displacement Amplification (SDA, Walker et. al. [1993], PCR Methods Appl. 3: 1-6, Becton-Dickinson Research Center) und Transcription-Mediated Amplification (TMA, Gen-Probe Inc., San Diego, CA), mit deren Hilfe bei extrem hoher Sensitivität Analytnukleinsäure-Konzentrationen gemessen werden können. Voraussetzung für den quantitativen Einsatz aller aufgeführten Technologien ist die Verfügbarkeit geeigneter synthetischer oder nativer Nukleinsäure-Standards exakt definierter Konzentration, die entweder als externe, d.h. in parallelen Ansätzen amplifizierte, oder interne Standards (d.h. simultan im selben Ansatz amplifizierte sog. Kompetitoren) verwendet werden. Während die Herstellung geeigneter Standards dem Fachmann bekannt ist (Zimmermann und Mannhalter 1996, Biotechniques 21: 268-279, Köhler et al. 1995, Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction -Nonradioactive PCR methods. Heidelberg, Springer-Verlag), bestehen bislang ungelöste verfahrenstechnische Probleme bei der Überführung dieser Standards eine anwendungsbereite und stabile Form, welches eine Grundvoraussetzung für die reproduzierbare Messung unbekannter Nukleinsäurekonzentrationen ist. Insbesondere

10

15

20

25

30



PCT/DE99/02715

bestehen Probleme bei der optimalen Lagerung hoch-verdünnter Nukleinsäuren. Diese beruhen im wesentlichen darauf, daß in der Praxis meist mit extrem niedrig konzentrierten Standard-Verdünnungsreihen gearbeitet wird (ca. 1 - 100000 Moleküle pro Reaktionsansatz), die trotz Lagerung bei Temperaturen zwischen -20°C und -80°C häufig instabil sind (Köhler et al. 1997, BioTechniques 23: 722-726). Diesem Problem wird u.a. so begegnet, daß niedrigkonzentrierte Nukleinsäure-Verdünnungen in der Form stabilisiert werden, daß der Verdünnung eine definierte Menge einer spezifischen Träger-Nukleinsäure zugesetzt wird, detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst zu Sequenzhomologie aufweist (De Kant et al. 1994, Biotechniques 17: 934-942, Köhler et al. 1997, BioTechniques 23: 722-726). Dies führt aber nicht immer zum Erfolg (siehe Figur 1), so daß allgemein empfohlen wird, alle erforderlichen Verdünnungsschritte ausgehend von einer Stammlösung definierter Konzentration tagtäglich neu durchzuführen. Dies wiederum ist aber mit dem Nachteil verbunden, daß die eingesetzten Standards arbeitsintensiv hergestellt werden müssen, variierender Pipettiergenauigkeit unterliegen und kostbare, verdünnte Chargen nur teilweise verbraucht werden können. Somit erhöhen sich zwangsläufig Kosten und Zeitaufwand bei gleichzeitig verringerter Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Methodik. Anwendungstechnisch gesehen ist die geschilderte Verfahrensweise somit unökonomisch, mehreren Störgrößen unterworfen und demzufolge für diagnostische Routinelabors ungeeignet.

2

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Gefäße und Methoden zu entwickeln, mit denen die oben erwähnten Nachteile der Verfahren gemäß dem Stand der Technik vermieden werden können und die einfach in der Anwendung, über einen längeren Zeitraum bei gleichbleibender Qualität lagerbar und Bestandteile von Testkits sein können.

Die Aufgabe wurde durch die Beschichtung von Reaktionsräumen mit definierten Standard-Nukleinsäurekonzentrationen gelöst, welches folgende Teilschritte enthält:

- Herstellung und Reinigung geeigneter adsorbierbarer Nukleinsäure-Standards
- Bestimmung der exakten Konzentration des Produktes mittels High Performance Liquid
 Chromatography (HPLC), nachfolgend Kalibrierung genannt
- Herstellung einer Verdünnungsreihe aus dem kalibrierten Standard unter Zusatz definierter Mengen einer Träger-Nukleinsäure
- erfindungsgemäße Adsorption der Standard/Trägernukleinsäuregemische an für enzymatische Amplifizierungsreaktionen geeignete Reaktionsräume, so daß diese als Standards einsetzbaren, definiert beschichteten Gefäße in eine über lange Zeiträume haltbar Form überführt werden, ohne daß es zu Beeinträchtigungen der Qualität kommt.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind ein Satz von mindestens 2 Oligonukleotiden, ein Testkit entsprechend Erfordernissen eines Routinelabors und mehrere Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens.

Die nachfolgend beschriebene Erfindung stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, das eine Grundlage zur vorzugsweise automatisierten quantitativen Messung kleinster Mengen von Analytnukleinsäuren in diversen biologischen Materialien in Verbindung mit vorhergehender enzymatischer Amplifikation darstellt. Das erfindungsgemäße Verfahren besteht darin, Nukleinsäuren in eine zur Standardisierung quantitativer enzymatischer Amplifizierungsreaktionen geeignete Form zu überführen. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß die erfindungsgemäße Methode die Herstellung von Nukleinsäurebeschichteten, sog. "ready-to-use" Standard-Reaktionsräumen erlaubt, die sich als einfach in der Anwendung erwiesen haben, die problemlos über einen langen Zeitraum bei gleichbleibender Qualität lagerbar und als Bestandteile von Testkits zu verwenden sind, somit den Bedürfnissen von Routinediagnostiklabors insbesondere in Hinblick automatisierter Analysen besser gerecht werden.

Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung sind einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und RNA, sowie DNA, deren native Desoxy-Thymidin (dT)-Basen durch Desoxy-Uracil (dU) vollständig oder partiell ersetzt sind. Die Herstellung geeigneter Nukleinsäure-Standards erfolgt in einer dem Fachmann bekannten Form, vorzugsweise mit Hilfe der PCR, unter Nutzung spezifischer Primer-Oligonukleotide (Beispiel 1, Punkt 1A-B). Als Nukleinsäure-Standards werden native, auf enzymatischem Wege hergestellte Amplifizierungsprodukte oder synthetische Nukleinsäuren verwendet, deren Nukleotidsequenz einer zu bestimmenden Sequenz homolog ist, vorzugsweise identisch oder gekennzeichnet durch eine oder mehrere Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen ist, die vorzugsweise außerhalb der Primer- und Sondenbindungsstellen liegen. DNA-Standards werden mittels enzymatischer Amplifikation von Target-Sequenzen, vorzugsweise mittels PCR, hergestellt, während RNA-Fragmente in bekannter Weise mittels in vitro RNA-Synthese unter Nutzung von RNA-Polymerasen (siehe Beispiel 2, Punkt 2.1., C) gewonnen werden können. Die hergestellten Nukleinsäurefragmente werden anschließend einer Reinigungsprozedur unterzogen, wobei DNA vorzugsweise mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Extraktion der Standard-Nukleinsäure aus dem Trenngel gereinigt wird (Beispiel 1, Punkt 1B), während in vitro hergestellte RNA in einer dem Fachmann bekannten Weise aus dem in vitro Sythese-Ansatz extrahiert wird (siehe Beispiel 2, Punkt 2.1., C). Die exakte Messung der Konzentration des gereinigten Nukleinsäure-Produktes erfolgt

20

30

10

20

25

30



vorzugsweise mittels HPLC (Köhler et al. 1997, BioTechniques 23:722-726, Beispiel 1, Punkt 2). Anschließend wird von der kalibrierten Standard-Nukleinsäure eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zur Verdünnung von DNA-Standards wird eine DNA-Lösung verwendet, die hergestellt wird, indem vorzugsweise DNA des Lambda-Phagen (z.B. Stamm: lambda cl 857 Sam 7, 48502 bp, Lambda-DNA) mittels 5 x 1-minütiger Ultraschall-Behandlung in Fragmente von ca. 1-2 Kilobasen (kb) überführt wird (Beispiel 1, Punkt 3; die durchschnittliche Fragmentlänge wurde mittels Agarosegelelektrophorese ermittelt). Dieser Schritt soll die verbesserte Adsorption während des Lyophilisationsprozesses bewirken und zu erhöhter Haltbarkeit der Standard-Nukleinsäure im Reaktionsraum beitragen. Es ist auch möglich, die Lambda-DNA unmodifiziert einzusetzen oder statt Lambda-DNA E. coli tRNA zu verwenden. Zur Verdünnung von RNA-Standards wird vorzugsweise eine Transport-RNA (tRNA)-Lösung verwendet (Köhler et al. 1995, Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction - Nonradioactive PCR methods. Heidelberg, Springer-Verlag, Beispiel 2, Punkt 2.2.). Zur Ouantifizierung eines Meßparameters werden verschiedene Standardverdünnungen hergestellt (Beispiel 1, Punkt 3, Beispiel 2, Punkt 2.2.), die vorzugsweise die Messung des gesamten physiologischen oder technologischen Konzentrationsbereiches des zu messenden Analyten erlauben. Hiervon werden Aliquote zur Beschichtung derjenigen Reaktionsräume verwendet, in welchen die zur Erstellung beispielsweise einer Eichkurve erforderlichen enzymatischen Nukleinsäureamplifikationen ablaufen sollen. Vorzugsweise werden 8 separate Reaktionsräume mit 8 verschiedenen Standardverdünnungen (sog. 8-er Strip) beschichtet. Erfindungsgemäß erfolgt die Beschichtung so, daß Aliquote der jeweiligen Standard-Nukleinsäure-Verdünnung supplementiert mit der Träger-Nukleinsäure direkt in den verwendeten Reaktionsräumen schonend getrocknet werden (Beispiel 1, Punkt 4, Beispiel 2, Punkt 2.3.). In einer besonders bevorzugten Weise erfolgt diese Lyophilisation unter Nutzung einer Vakuum-Zentrifuge oder einer Gefriertrocknungsanlage. In einer weiteren Form der Ausgestaltung erfolgt die Trocknung mittels eines gleichwertigen Trocknungsverfahrens, beispielsweise einem Verfahren zur überhitzungsfreien Produkttrocknung unter Einsatz von Mikrowellen (z.B. vertrieben über GWE mbH, Leuna). Die -wie beschrieben- hergestellten, beschichteten Reaktionsräume sind dadurch gekennzeichnet, daß die adsorbierten Nukleinsäure-Standards so fest an der Innenseite des zur Beschichtung verwendeten Reaktionsraumes haften, daß beispielsweise ein problemloser Versand auf dem Postweg gewährleistet werden kann.

In den Figuren 1-4 ist beispielhaft dargestellt, welche Qualitätsanforderungen die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Nukleinsäure-Standards erfüllen. Zum praxis-

20°C als auch Raumtemperatur stabil (Figur 4, Beispiel 2).

10

15

20

25

relevanten Test der auf dem beschriebenen Verfahren basierenden Produkte ist das derzeit beste, äußerst reproduzierbare Ergebnisse liefernde ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) eingesetzt worden. Mit diesem Detektionsautomaten lassen sich unter Nutzung des erfindungsgemäßen Verfahrens prinzipiell hoch reproduzierbare Eichkurven mit Korrelationen >-0.99 erstellen (Figur 1). Die erfindungsgemäß mit DNA beschichteten Reaktionsräume (Beispiel 1), z.B. die sog. "Optical" PCR Tubes, sind dem derzeitigen Stand der Technik überlegen, da diese im Vergleich zu herkömmlich eingesetzten PCR-Standards deutlich stabiler sind (Figur 2) und selbst bei Raumtemperatur über mindestens 1 Jahr ohne Qualitätsverlust lagerbar sind (Figur 3). Erfindungsgemäß mit in-vitro synthetisierter RNA beschichtete Reaktionsräume sind für mindestens 6 Monate sowohl bei –

PCT/DE99/02715

Die beschichteten Reaktionsgefäße werden aufrecht stehend in einer geeigneten, mindestens 96 Gefäße aufnehmenden Träger-Box erfindungsgemäß mit einer selbsthaftenden Folie (z.B. Plastik- oder Aluminium-Folie, Parafilm) verschlossen, um eine Kontamination mit Fremd-Nukleinsäuren während Lagerung und Transport zu vermeiden. Je ein mit Folie verschlossener 8-er Strip, somit 8 verschiedene Konzentrationen der zur Beschichtung eingesetzten Nukleinsäuren enthaltend, wird als "ZeptoStrip" bezeichnet.

In den Reaktionsräumen können neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens 2 spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten sein. Alternativ können verwendete Reaktionsräume auch alleinig die als spezifische als Primer bzw. Sonden fungierenden Oligonukleotide, die Trägererforderliche Amplifikation Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten. Die erfindungsgemäßen Testkits bestehen aus mindestens einem "ZeptoStrip", mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure.

Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination bekannter Elemente und neuer Lösungswege, die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr ready-to-use Standard-Reaktionsräume für den quantitativen Nachweis ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen zur Verfügung stehen.

Neben dem Abstellen der oben genannten Nachteile des Standes der Technik weist das erfindungsgemäße Verfahren somit eine Reihe von Vorteilen auf:

WO 00/12756 PCT/DE99/02715

1. Ein manueller oder automatisierter Transfer von verdünnten, zur Standardisierung eingesetzten Nukleinsäuren in die verwendeten Reaktionskompartimente entfällt, da diese bereits im Reaktionsgefäß in lyophilisierter Form vorliegen. Damit erhöht sich wesentlich die Nutzerfreundlichkeit, da die sofort einsetzbaren Standard-Strips nur entnommen und in eine 96-well Trägerplatte eingesetzt werden müssen. Nach Zugabe der vorzugsweise vorgemischten Reagenzien für die nachfolgende Amplifizierungsreaktion sind keine weiteren Manipulationen mehr notwendig. Diese Vereinfachung erlaubt somit eine konsequente Automatisierung quantitativer enzymatischer Reaktionen.

5

10

15

20

- 2. Da nunmehr keine Pipettierung konzentrierter Standards mehr erfolgt, ist eine potentielle Kontaminationsquelle ausgeschaltet und somit die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse deutlich verringert.
 - 3. Durch Überführen der Standard-Nukleinsäuren in ein nicht-wäßriges Milieu wird a) potentiell ein unerwünschter mikrobieller Abbau der als Standards verwendeten Nukleinsäuren eingeschränkt bzw. verhindert, und b) eine Lagerfähigkeit selbst extrem niedrig konzentrierter Nukleinsäuren über längere Zeiträume selbst bei Zimmertemperatur erreicht (Figur 2-4). Diese Vorzüge vereinfachen ganz wesentlich sowohl Versand als auch Anwendung der auf diesem Verfahren beruhender Testkits.
- 4. Die verwendeten Träger-Nukleinsäuren verhindern eine unspezifische Standard-Adsorption an die zur Herstellung der Verdünnungsreihen eingesetzten Einweg-Materialien und sind -nachweisbar bei Zusatz zu einem PCR-Ansatz- gleichzeitig ein potenter "Enhancer" der enzymatischen Amplifikation.

Figur 1 zeigt eine typische Eichkurve, die mittels "real-time" PCR-Produktmessung am ABI PRISMTM 7700 Sequence Detection System unter Nutzung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellter mdm-2 (murine double minute-2) Nukleinsäurestandards (Verwendung eines Standard-Strips, d.h. 8 verschiedener, lyophilisierter mdm-2 Standard-Nukleinsäurekonzentrationen) erhalten wurde (Beispiel 1, Punkt 5). Die errechnete Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall -0.996.

Figur 2 zeigt in graphischer Form den Vergleich des erfindungsgemäßen Beschichtungsverfahrens und Nutzung der "real-time" Detektion wie in Figur 1 mit dem derzeitigen Stand der Technik. Herkömmliche, d.h. in wäßrigem Milieu gelagerte und am Versuchstag aliquotierte mdm-2 Standard-DNA Fragmente verschiedener Konzentration (50, 250, 2500, 10000 und 50000 Moleküle pro PCR-Ansatz), supplementiert mit Träger-DNA, wurden mit lyophilisierten Standards gleicher Konzentration verglichen. Während

WO 00/12756 PCT/DE99/02715 7

konventionell gelagerte Standards insbesondere sehr niedriger Konzentration (50 bzw. 250 Moleküle pro Ansatz) bereits nach 14 Tagen Lagerung und 4-maligen Einfrier-/Auftau-Zyklen vollständig abgebaut sind (äußert sich in der Abbildung durch Erreichen des Threshold Cycles 40, welcher der Amplifizierbarkeit 0 entspricht), ist bei Verwendung lyophilisierter Standards (ZeptoStrip) selbst bei niedrigsten verwendeten Nukleinsäurekonzentrationen kein Verlust feststellbar.

Figur 3 zeigt PCR-Resultate, die mit ZeptoStrips "mdm2-DNA" erhalten wurden, welche über einen Zeitraum von 1 Jahr alternativ entweder bei -20°C oder bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Es ist zu erkennen, daß unabhängig von der Lagertemperatur identische PCR-Ergebnisse, d.h. weitgehend übereinstimmende C_T-Werte (d.h. parallele Kurven) erzielt wurden. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß die immobilisierte mdm2-DNA unabhängig von der Ansatzkonzentration und der Lagertemperatur über den gesamten untersuchten Zeitraum stabil bleibt.

Figur 4 zeigt TaqMan-PCR-Resultate, die mit ZeptoStrips "bcl2-cRNA" erhalten wurden, welche über einen Zeitraum von 6 Monaten alternativ entweder bei -20°C oder bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Analog den Ergebnissen für mdm2-DNA war auch immobilisierte bcl2-cRNA unabhängig von der Ansatzkonzentration und der Lagertemperatur über den gesamten untersuchten Zeitraum stabil.

- Die erfindungsgemäße Verwendung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsgefäße 20 liegt in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen. Die Testkits bestehen aus mindestens einem mit Folie verschlossenen 8-er Strip, mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure.
- Die folgenden Beispiele dienen der Verdeutlichung der Erfindung, ohne sie auf diese 25 Beispiele zu beschränken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1.

30

Beschichtung von Polypropylen-Reaktionsräumen ("Optical Tubes") mit definierten Konzentrationen von doppelsträngiger mdm-2 Standard-DNA



1.1. Herstellung eines mdm-2 spezifischen Standard-DNA Fragmentes mittels PCR

- A. cDNA-Herstellung aus Gesamt-RNA, isoliert aus ADR5000 T-Lymphom-Zellinie (resistenzselektiert mit 5 μg Adriamycin pro ml Kulturmedium)
- ο 1 μg mittels RNAzolTM "B" (Tel-Test, Friendswood, TX, USA) gereinigte RNA in einem 20-μl Standard Reaktionsansatz, bestehend aus AMV Reverse Transcriptase Puffer (250 mmol/l Tris/HCl, pH 8.3; 250 mmol/l KCl, 50 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l Dithiothreitol, 2.5 mmol/l Spermidin), 5 U AMV Reverse Transcriptase, 0.5 mmol/l eines jeden dNTPs (Promega, Madison, WI, USA), 10 U rekombinanter RNase Inhibitor (AGS, Heidelberg, FRG), 200 ng Oligo (dT) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 1 Std. bei 42 °C in cDNA transkribieren

B. PCR-Amplifizierung und Reinigung des Produktes

 \triangleright PCR

10

15

20

25

30

- o Je 2 μl-Aliquote der hergestellten cDNA werden in 6 identischen 50-μl Standard PCR Ansätzen bestehend aus 100 ng jedes 3' bzw. 5' Primers, 5 μl 10x Taq Polymerase Puffer (100 mmol/l Tris/HCl, pH 8.3; 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂, 0.01% [wt/vol] Gelatine), 1.5 U AmpliTaq® Polymerase (Norwalk, CT, USA, Perkin-Elmer), und 8 μl dNTPs (0.2 mmol/l jedes Nukleotids unter Verwendung von dUTP anstatt dTTP) im GeneAmp®9600 Thermalcycler (Perkin-Elmer) amplifiziert.
- Programm: 94°C für 30 s, 55°C für 30 s, 72°C für 1 min
 35 Zyklen
- Sequenzen der verwendete Amplifizierungsprimer (GenBank Accession Code für mdm-2:
 I25341)

MDM2PR1 (1245-1264) 5'-GCC.AAG.AAG.ATG.TGA.AAG.AG-3'
MDM2PR2 (1439-1455) 5'-ACT.GGG.CAG.GGC.TTA.TT-3'

• Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes: 211 bp

A

- > Reinigung des 211 bp Fragmentes mittels Agarosegel-Elektrophorese
- o 1.5 % Agarose-Gel (Easy-Cast™ Minigel, AGS, Heidelberg) herstellen, Gelslots mit 6er Kamm, Kammer mit TAE-Puffer füllen (Submarine-Gel)
- o die hergestellten PCR-Ansätze poolen und quantitativ auftragen
- Elektrophorese bei 100V, 45 min ausführen

- Ethidiumbromid-gefärbte Banden im UV-Licht sichtbar machen, möglichst genau und schnell mit Skalpell ausschneiden, in 1.5 ml-Eppendorfgefäße überführen
- DNA aus Gelblocks mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilten) laut Vorschrift reinigen (Elution mit H₂O)

1.2. Kalibrierung der Standard-Stammlösung mittels HPLC

> HPLC-Equipment:

3-Line Degasser DG-980-50, PU-980 Intelligent HPLC Pump, Low Pressure Gradient Former, UV-975 UV/VIS Detector, AS-950 Intelligent Sampler, Column-Thermostat Jetstream 2 (Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, FRG).

> Stationäre Phase:

10

15

25

30

TSK DEAE-NPR Säule (4.6 mm ID, Länge: 35 mm) und DEAE-NPR Vorsäule (4.6 mm ID, Länge: 5 mm) (TosoHaas GmbH, Stuttgart, FRG)

▶ Mobile Phase:

Puffer A: 25 mmol/l Tris/HCl, 1 mol/l NaCl; pH 9.0

Puffer B: 25 mmol/l Tris/HCl; pH 9.0

> HPLC-Laufbedingungen:

• Druck: 80-120 bar (maximal 200 bar)

• Flußrate: 1 ml/min

• Temperatur: 20°C

- UV-Detektion bei 260 nm
- Analyt: ca. 10-200 ng gereinigtes PCR-Fragment, mit Puffer B auf 40 μl supplementieren, Injektion von 20 μl pro Lauf jeweils in Doppelbestimmung
- Standard (separater Lauf): 36 μl Puffer B plus 4 μl Low Mass DNA LadderTM (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), bestehend aus 6 glatt-endigen DNA-Fragmenten im Bereich 100 bis 2000 bp (Endkonzentration: 5 bis 100 ng DNA pro Bande), Injektion von 20 μl pro Lauf (Doppelbestimmung)
- Diskontinuierliches Gradientenprogramm über 25 min wie folgt durchführen:
 - 1. Equilibrierung der Säule mit 25% Puffer A in Puffer B

2. 25% A in B: Probenauftrag bis 0.5 min

3. 25-43% A in B: Linearer Gradient von 0.5-4.5 min

4. 43-60% A in B: Linearer Gradient von 4.5-20 min

5. 60-100% A in B: Linearer Gradient von 20-22 min

6. 100-25% A in B: Linearer Gradient von 22-24 min



7. 25% A in B:

Equilibrierung von 24-25 min

Die Datengewinnung erfolgt mittels Integration der Peaks durch BorwinTM Chromatography Software, Version 1.20 (IMBS Developpements, Frankreich). Zur exakten Messung der Konzentration des gereinigten DNA-Standards wird die Fläche unter den individuellen Peaks ermittelt. Die unbekannte Konzentration der Standard-Nukleinsäure wird anhand der mittels Low Mass DNA LadderTM erhaltenen Eichkurve berechnet.

1.3. Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe mit Träger-DNA

Träger-Nukleinsäure:

10

15

10 OD Lambda (dam+) DNA (aus Bakteriophage lambda cl857 Sam7, AGS GmbH, Heidelberg), gelöst in 0.5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, wird in 5x 1 min-Intervallen und zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis mittels Ultraschall-Bad (Transsonic T570, Ultrasonics) bei maximaler Leistung in ca. 1-2 kb-Fragmente überführt, davon wird eine 10 ng/ml-Verdünnung hergestellt (1:100), im weiteren als Lambda-DNA bezeichnet.

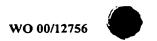
Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe für mdm-2 (20x conc.)

Standard-	Verdünnung SL	Endkonzentration	Moleküle pro	
No.	(Herstellung)	[zmol/Ansatz]	Ansatz	
1	1: 104	419.75	252.773	
2	1: $10^4 \rightarrow 1:5$ (20μl[No.1]+80μl λ)	83.95	50.555	
3	1: $10^4 \rightarrow 1:10$ (10μl [No.1]+90μl λ)	41.986	25.277	
4	1: $10^4 \rightarrow 1:25$ (10μl [No.3]+90μl λ)	16.794	10.111	
5	1: 10^5 → (20μl [No.3]+180μl λ)	4.199	2.528	
6	1: $10^6 \rightarrow 1:4$ (25μl [No.5]+75μl λ)	1.050	632	
7	1: $10^6 \rightarrow 1:10$ (10μl [No.5]+90μl λ)	0.420	253	
8	1: $10^6 \rightarrow 1:50$ (2μl [No.5]+98μl λ)	0.084	51	

 $\lambda = \text{Lambda-DNA}, 10 \text{ ng/}\mu\text{l}$

20

Zur Herstellung der Standard-Gebrauchslösungen werden je 5 μl der Standard-Verdünnungsreihe in separate 1.7 ml Multi Twist Top Vials (Sorenson Bio Science, Salt Lake City, UT, USA; Vertrieb: Carl Roth GmbH.: Kat.-Nr.: 8184.1) pipettiert. Zur Herstellung



multifunktioneller Strips (d.h. Strips, die zur sequentiellen oder simultanen quatitativen Messung mehrerer verschiedener Nukleinsäure-Sequenzen geeignet sind) werden weitere 19 Standards (jeweils 5 µl pro Standard-Nukleinsäure) zugesetzt und -wenn erforderlich- bis zu einem Endvolumen von 100 µl mit Lambda-DNA ergänzt.

11

1.4. Beschichtung der Reaktionsräume

- je 5 μl der unter Punkt 3 hergestellten Standard-Gebrauchslösungen in 8 verschiedene "optical tubes" (Fa. Perkin-Elmer, Kat.-Nr.: N8010935) pipettieren (von Position Al-A8 in abnehmender Konzentration), vorzugsweise diese Aliquotierung zur Verbesserung der Qualität mit einem Pipettier-Roboter (z.B. Biomek 2000, Fa. Beckman) ausführen
- Amplifikationsgefäße in schwarze Eppendorf Zentrifugen-Adapter (0.2 ml) einsetzen und Proben 30 min lang in Vakuumzentrifuge (z.B. Univapo 100 H mit Unijet Refrigerated Aspirator, Fa. UniEquip) bis zur völligen Trockene bei eingeschalteter Rotor-Gegenheizung lyophilisieren.

1.5. Test der hergestellten Strips mittels ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

optimierte mdm-2 TaqMan™-Methode:

Programm:

10

15

20

2-Step-PCR 95°C 10:00 min, anschließend

40 Zyklen

95°C 00:15 min

60°C 01:00 min

25 Reaktionsbedingungen:

6 mM MgCl₂

10 pM Primer mdm2Pr11 und mdm2Pr21

2 pmol mdm2Probe

50 ng Lambda-DNA (5 μl)

2.5 U AmpliTaqGold™

30 dNTPs, Puffer aus TaqManTM PCR Core Reagents Kit mit AmpliTaqTMGold

Ansatzvolumen: 50 µl

verwendete Primer- und Sondensequenzen (GenBank Accession Code für mdm-2: I25341)

mdm2Pr11 (1295-1318) 5'-GAG.AGT.GTG.GAA.TCT.AGT.TTG.CCC-3'

mdm2Pr21 (1352-1373) 5'-TGC.AAC.CAT.TTT.TAG.GTC.GAC.C-3'

mdm2Probe (1320-1350) 5'-FAM-TTA.ATG.CCA.TTG.AAC.CTT.GTG.
TGA.TTT.GTC.A-XT-3'-TAMRA

5 Beispiel 2.

Beschichtung von Polypropylen-Reaktionsräumen ("Optical Tubes") mit definierten Konzentrationen von bel2 Standard-copy RNA (cRNA)

2.1. Herstellung von bel2 Standard cRNA, die sequenz-homolog zu nativer bel2mRNA ist

(nach einer modifizierten Methode von:: Grassi G, Zentilin L, Tafuro S, Diviacco S, Ventura A, Falaschi A, Giacca M. A rapid procedure for the quantitation of low abundance RNAs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res 1994; 22: 4547-4549)

15

20

25

10

- A. Herstellung von bcl2 Template DNA mit inkorporiertem T7-Promoter
 - > Herstellung eines bcl2 Target-Fragmentes mit PCR1
 - o 100 ng CCRF ADR5000 cDNA (siehe Beispiel 1.1, A) wurden wie unter Beispiel 1.1, B in einem TRIO-Thermoblock™ 48 Thermal Cycler (Biometra, Göttingen) amplifiziert.

Temperaturprofil PCR1:

94°C für 30 s, 55°C für 30 s, 72°C für 1 min

40 Zyklen

 Sequenzen der verwendeten Amplifizierungsprimer (GenBank Accession Code f
ür bcl2: M14747)

BCL2PR1 (3498-3516):

5'-CTT.TTG.CTG.TGG.GGT.TTT.G-3'

BCL2PR2 (3896-3915):

5'-CTT.CTC.CTT.TTG.GGG.CTT.TT-3'

- Theoretische Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes: 418 bp
 - ➤ Inkorporation der T7-Promotersequenz in das synthetisierte bcl2-Target-Fragment mittels PCR2

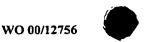


Tabelle 2/1: Pipettierschema für PCR2 (Herstellung von 6 identischen Ansätzen)

Reaktionskomponenten	Ansatzvolumen
	μl
H ₂ O (HPLC-rein)	21,5
10x PCR-Puffer mit 1.5 mM MgCl ₂ (PE Applied Biosystems)	5
dNTPs (je 1,25 mM, Promega/Boehringer Mannheim)	8
Primer bcl2-1T7 (50 ng/µl), verdünnt mit H ₂ O	6
Primer bcl2Pr2 (50 ng/µl), verdünnt mit H ₂ O	2
bcl2-Target Produkt (siehe 2.1. A, 1:1000 verdünnt mit H ₂ O)	5
AmpliTaq Gold (0,5 U/µl, PE Applied Biosystems)	2,5

- Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Temperaturprofil:
 einmalig 95°C für 10 min, 40 Zyklen 95°C für 30 sec, 55°C für 30 sec, 72°C für 1¹ min,
 einmalig 72°C, 5 min, 4°C ∞
- Sequenzen der verwendeten Amplifizierungsprimer:

BCL2PR2 (3896-3915): (siehe oben)

10

bcl2-1T7: (unterstrichene Sequenz: T7-Promoter)

- $\verb§5'-cgg.gat.ccg.gat.cct.aat.acg.act.cac.tat.agg.gag.aCT.TTT.GCT.GTG.GGG.TTT.TG-3'$
- Theoretische Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes: 455 bp
 - B. Reinigung und Kalibrierung des bcl2T7-DNA-Fragmentes wie unter Beispiel 1.1. und 1.2. beschrieben
- 15 C. In-vitro cRNA-Synthese (Herstellung von 3 identischen Ansätzen)

Tabelle 2/2: Pipettierschema zur Herstellung der bcl2-cRNA-Syntheseansätze

Reaktionskomponenten	Ansatzvolumen	
	μΙ	
RNase-freies H ₂ O (mit DEPC behandelt)	1	
10x Transcription Buffer (Boehringer Mannheim)	2	
ATP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1	
UTP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1	
GTP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1	

CTP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1
gereinigtes bcl2-T7 dsDNA Fragment (6 ng/μl)	10
T7-RNA Polymerase (Boehringer Mannheim, 20U/μl)	2
RNase-Inhibitor (Amersham Pharmacia,10 U/μl)	1

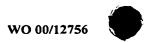
WO 00/12756

5

10

- o Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 1 Std. bei 37°C im Thermoschüttler.
- Zur Erhöhung der cRNA-Ausbeute wurden nach Ablauf der Inkubation weitere 20 U T7
 Polymerase pro Ansatz zugesetzt, danach wiederum Inkubation für 1 Std. bei 37°C (Thermoschüttler).
- Anschließend wurden alle drei Ansätze vereinigt und mit 60 U DNase I (RNase-frei, Boehringer Mannheim) für 50 min bei 37°C verdaut.
- Die Reinigung der cRNA erfolgte mittels konventioneller Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol- (25:24:1) Extraktion wie in: Köhler T, Laßner D, Rost A-K, Thamm B, Pustowoit B, Remke H Eds.): Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction -Nonradioactive PCR methods., Springer-Verlag Heidelberg, S. 36-37 beschrieben.
- Die Fällung der cRNA wurde für ca. 3 Std. bei -20°C durchgeführt, danach wurde 3x mit 300 μl 75% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Pellett unter 100 μl 96%igem Ethanol über Nacht bei -20°C gelagert.
- o Am nächsten Tag erfolgte die Trocknung des Pelletts in einer Vakuum-Zentrifuge (Univapo 100 H, UniEquip), das getrocknete Pellett wurde in 25 μl DEPC-H₂O gelöst, die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach UV 260/280-Messung von 2x 2 μl-Aliquoten in 500 μl-Quartzküvetten.
- Die Gesamtausbeute aller 3 Ansätze betrug ca. 23 μg cRNA bei einem Ratio 260/280
 >1,8.
 - D. Charakterisierung der synthetisierten cRNA mittels nicht-denaturierender Agarosegel-Elektrophorese

(nach einer modifizierten Methode von: Collins ML, Zayati C, Detmer JJ, Daly B, Kolberg JA, Cha TA, Irvine BD, Tucker J, Urdea MS. Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. Anal Biochem 1995; 226:120-129)



5

15

20

- Eine Minigel-Kammer (Easy-Cast™, AGS Heidelberg) wurde über Nacht mit 2%-iger Absolve NEF-971G Reinigungslösung (DuPont) RNase-frei gemacht, anschließend wurde 2x mit DEPC-H₂O gespült.
- Herstellung des Gels: 1%-iges Agarosegel (Qualex-Gold-Agarose, AGS) mit 1x TAE-Puffer (aus 50x Stammlösung mit DEPC-H₂O) herstellen (Ethidiumbromid [1,6 μl 10% EtBr] eingegossen), 10er Kamm; Laufpuffer: 1x TAE (4 μl EtBr/100 ml)
 - Zur gereinigten und resuspendierten cRNA (ca. 1 μg pro 4 μl Volumen) sowie 4 μl einer 0,16-1,77 Kb RNA-Ladder (Gibco BRL) wurden 4 μl Formamid zugeben, und anschließend 5 min bei 65°C inkubiert.
- Danach erfolgte eine rasche Abkühlung auf Eis sowie anschließende Zugabe von 1 μl Gelladepuffer (RNase-frei) pro Tube, vom fertigen Ansatz werden 4 μl-Aliqote in die Testgel-Taschen pipettiert (Marker in die Außenslots, cRNA-Probe in die Innenslots).
 - Die elektrophoretische Trennung wurde für ca. 2 Std. bei 80 V in der im Eisbad gekühlten, RNase-freien Minigel-Kammer durchgeführt. Eine Pufferzirkulation wurde durch intermittierende Bewegung des Laufpuffers in der Kammer erreicht.
 - Die RNase-freie Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mittels GelPrint Video Documentation Workstation (MWG-Biotech, Ebersberg) unter Nutzung von ONE-Dscan™ Software (Scanalytics, Billerica, MA, USA).
 - Dem theoretischen Molekulargewicht der synthetisierten bcl2-cRNA von 418 b stand ein experimentell bestimmtes Molekulargewicht von ca. 400 b gegenüber.

2.2. Herstellung einer bcl2-cRNA-Verdünnungsreihe

Die Verdünnung der gereinigten bcl2-cRNA erfolgte mit E.coli tRNA-Lösung (100 ng/μl DEPC-H₂O, Boehringer Mannheim).

Tabelle 2/3: Herstellung einer bcl2-cRNA-Verdünnungsreihe nach folgendem Schema:

Standard	cRNA-Verdünnungsfaktor	RNA-Konzentration (Angabe in
Nr.		zmol pro 5 µl verdünnter Lösung)
1	1:103	1610
2	1:104	161,05
3	1:105	16,105
4	1:10 ⁵ → 1:5	3,22





5	1:106	1,6105		
6	1:10 ⁶ → 1:5	0,322		
7	1:107	0,16105		
8	1:108	0,016105		

2.3. Beschichtung von 96 "Optical Tubes,, (1 Platte) mit bcl2 Standard-cRNA definierter Konzentration

- Von jeder bc12-cRNA-Verdünnung (siehe Tabelle 2/3) wurden 150 µl hergestellt und in ein bereitgestelltes, kühlbares Rack einer Biomek®2000 Pipettierworkstation (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) positioniert.
 - Eine 96-well Trägerplatte wurde mit 96 "Optical Tubes,, beschickt und ebenfalls in die dafür vorgesehene Position der Workstation gesetzt.
- Mit Hilfe des Roboters und unter Nutzung geeigneter, gestopfter Einweg-Pipettenspitzen 10 wurden je 5 µl von Standard "1, in die "Optical Tubes, der Position Al-Al2, von Standard "2,, in Tubes B1-B12, von Standard "3,, in Tubes C1-C12 usw. pipettiert.
 - Die Standard-cRNA enthaltenen Gefäße wurden anschließend komplett für 30 min bei -80°C schockgefroren und unter Vermeidung eines zwischenzeitlichen Auftauens sofort in einer vorgekühlten Lyovac GT2 (AMSCO Finn-Aqua GmbH, Hürth) für 1 Std. lyophilisiert.
 - Anschließend wurden die Tubes mit einer selbstklebenden Folie (z.B. Biomek™ Seal & Sample Aluminium-Folien, Beckman Instruments) manuell verschlossen. Die ZeptoStrips "RNA, wurden generiert, indem die an den Tubes anhaftende Folie vertikal so geschnitten wurde, daß zusammenhängende Strips der Positionen A1-H1, A2-H2, A3-H3 usw. entstanden, welche jeweils eine Konzentration einer jeden bcl2-cRNA Verdünnung enthielten.
 - Von den nunmehr hergestellten 12 Strips wurden je 6 Strips alternativ entweder bei -20°C oder bei Zimmertemperatur über den untersuchten Zeitraum gelagert

2.4. Analyse der hergestellten bcl2 cRNA Strips mittels ABI PRISM™ 7700 Sequence **Detection System**

A. Materialien:

15

20

25

- 5x TaqMan EZ Puffer: 250 mM Bicine, 575 mM K-acetate, 0.05 mM EDTA, 300 nM
 ROX (6-carboxy-tetramethyl-rhodamin), 40% (w/v) Glycerol; pH 8.2
- 25 mM Mn(OAc)₂
- dNTPs: dATP (10 mM), dCTP (10 mM), dGTP (10 mM) und dUTP (20 mM) im
 Volumenverhältnis 1:1:1:1 gemischt
- B. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

bcl2Prl (3498-3516)

wie oben

bcl2Pr21 (3572-3591)

5'-GCA.AGT.GCA.GCC.ACA.ATA.CT-3'

bcl2Sonde (3547-3568)

5'-FAM-CAG.TTC.TGG.GGC.CAA.GAG.GCT.GTXT-3'-

TAMRA

(FAM = 6-carboxyfluorescein, TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine)

- C. Kombinierte Reverse Transcription und PCR (RT-PCR) unter Nutzung des Enzyms rTth Polymerase (PE Applied Biosystems)
- Am jeweiligen Versuchstag wurden in je einen der alternativ bei -20°C oder Raumtemperatur gelagerten bcl2-cRNA Strips folgende Reaktionskomponenten pipettiert (Tabelle 2/4, S = Standard-Nr., Ansatzvolumen: 50 μl)

Tabelle 2/4: PCR3

15

20

Reaktionskomponente	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
DEPC-H ₂ O	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
5x EZ-Puffer mit ROX	10	10	10	10	10	10	10	10
dNTPs für TaqMan	6	6	6	6	6	6	6	6
bcl2Pr1 (50 ng/μl)	1	1	1	1	1	1	1	1
bcl2Pr21 (50 ng/μl)	1	1	1	1	l	1	1	1
bcl2-Sonde (0,79 pmol/µl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Mn (OAc) ₂ , 25 mM	5	5	5	5	5	5	5	5
rTth-Polymerase (PE Applied	2	2	2	2	2	2	2	2
Biosystems, 2.5 U/μl)								

Temperaturprofil am ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System:

59°C, 30 min (Reverse Transcription)

95°C, 5 min

40 Zyklen

95°C, 15 sec

59°C, 1 min

o Mittels PCR3 (Tabelle 2/4) wurde die Stabilität von erfindungsgemäßen bcl2-cRNA Strips nach jeweils 7, 14, 28, 90 und 180 Tagen Lagerung (sowohl –20°C als auch Raumtemperatur) analysiert. Die Ergebnisse sind in Figur 4 zusammengefaßt.

10 Legende zu den Figuren

Figur 1:

15

20

Charakteristische Eichkurve, erstellt mittels PCR-Produkt Messung am ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System unter Verwendung eines "ZeptoStrips", welcher mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit mdm-2 DNA beschichtet wurde, sowie der zugehörigen Methode (siehe Ausführungsbeispiel 1, Punkt 5), r = -0.996.

Figur 2:

Vorteile von ZeptoStrips (ZS) im Vergleich zu Standard-Nukleinsäuren, die nach derzeitigem Stand der Technik konventionell im wäßrigen Milieu gelagert wurden. Gestrichelte Linien: konventionelle Lagerung, durchgezogene Linien: ZeptoStrip. Legende: Initiale Zahl von Nukleinsäuremolekülen per PCR-Ansatz.

Figur 3:

Lagerfähigkeit von ZeptoStrips mdm2-DNA über einen verfolgten Zeitraum von 1 Jahr ohne Qualitätsverluste. Legende: Initiale Zahl von Nukleinsäuremolekülen pro PCR-Ansatz. Durchgezogene Linien: Lagerung bei +25°C, gestrichelte Linien: Lagerung bei -20°C.

Figur 4:

Stabilität von ZeptoStrips "bcl2-cRNA,,, die über einen Zeitraum von 6 Monaten alternativ entweder bei –20°C oder bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Dargestellt sind die für jede Standard-Konzentration berechneten Regressionsgeraden unter Berücksichtigung aller jeweils bei –20°C und +25°C-Lagerung erhaltenen Meßwerte. Legende: Konzentration der im Reaktionsraum immobilisierten bcl2-cRNA in zeptomol pro Ansatz.

Patentansprüche

5

10

15

20

35

WO 00/12756

- Mit nativen, synthetisch oder enzymatisch hergestellten Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung auf nicht-kovalentem Wege an chemisch oder biochemisch nicht-modifizierte Oberflächen der Innenwandung von Reaktionsräumen erfolgt.
- 2. Reaktionsräume nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Glas- oder Plastik-Gefäßen oder aus Glaskapillaren bestehen, die mit nativen, synthetischen oder partiell-synthetischen Nukleinsäuren (DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA) beschichtet sind.
- 3. Verfahren zur Herstellung der Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 und 2 unter Verwendung von Standard-Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß definierte Mengen gelöster nativer, synthetischer oder partiell-synthetischer Nukleinsäuren (DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA) direkt in zur enzymatischen Amplifikation geeignete Reaktionsräume aliquotiert werden und die Nukleinsäure anschließend nicht-kovalent direkt an die Innenwandung des Reaktionsraumes durch schonende Lyophilisierung der Probe adsorbiert wird.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Gefäße bzw. Glaskapillaren beschichtet werden.
- 5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß konzentrierte Stock-Lösungen der zu adsorbierenden Nukleinsäuren mittels eines geeigneten Analyseverfahrens exakt kalibriert werden, bevor diese zur Herstellung der zur Beschichtung verwendeten Nukleinsäure-Verdünnungsstufen eingesetzt werden.
- Overfahren nach den Ansprüchen 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß während des Lyophilisationsprozesses den zu adsorbierenden Standard-Nukleinsäuren eine definierte Menge einer spezifischen Träger-Nukleinsäure beigemischt wird, die zuvor mittels eines physikalischen Verfahrens (z.B. Ultraschallbehandlung) in Fragmente einer mittleren Länge von ca. 1-2 kb überführt wurde oder unmodifiziert verwendet wird und welche der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst minimale Sequenzhomologie aufweist.
 - 7. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA des Lambda-Phagen oder E. coli tRNA eingesetzt wird.
 - 8. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß entsprechende Reaktionsräume simultan mit einer Vielzahl (mindestens 2) diverser, Analytsequenz-

5

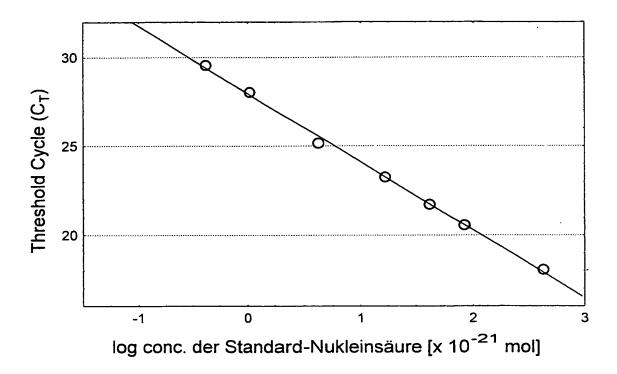
10

15

25

- spezifischer kalibrierter Nukleinsäuren, ggf. unterschiedlichem zellulären oder organischen Ursprungs bzw. aus verschiedenen Spezies stammend, beschichtet werden.
- 9. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung von mindestens 96, im Mikrotiterplatten-Format angeordneten Reaktionsräumen mit mindestens 12x 8 sequenzspezifischen Standard-Nukleinsäuren abnehmender, den gesamten physiologischen oder technologischen Konzentrationsbereich der zu messenden Analytnukleinsäure erfassenden Konzentrationen (höchste Konzentration: A1-12, niedrigste Konzentration: H1-12), erfolgt.
- 10. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die beschichteten Reaktionsräume aufrecht stehend in einer geeigneten, mindestens 96 Gefäße aufnehmenden Träger-Box verschlossen werden.
- 11. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 10, wobei in den Reaktionsräumen neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens 2 spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten sind oder spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in separaten Gefäßen ohne Nukleinsäure-Standard in lyophilisierter Form enthalten sind.
- 12. Verwendung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume nach den Ansprüchen l bis 11 in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.
 - 13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Testkits aus mindestens einem mit Folie verschlossenen ZeptoStrip (8-er Strip aus verschlossenen, mit 8 verschiedenen Nukleinsäure-Konzentrationen beschichteten Reaktionsräumen), mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure bestehen.

Figur 1



į,

.

-

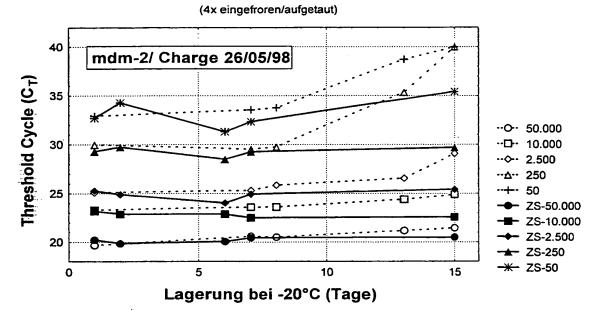
-

This Page Blank (uspto)

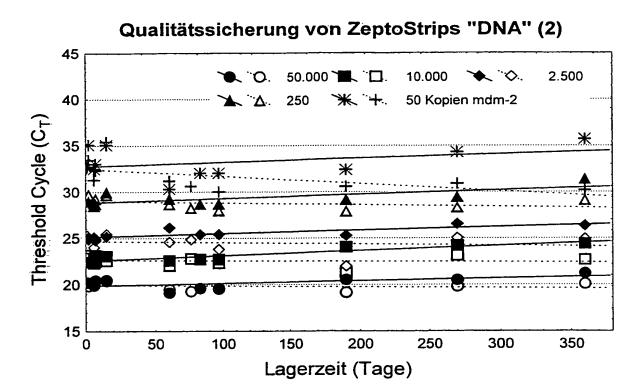
Figur 2

Qualitätssicherung von ZeptoStrips (1)

ZeptoStrip im Vergleich zu konventioneller Lagerung



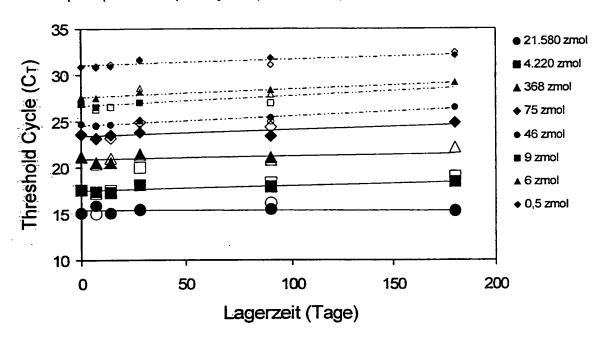
Figur 3





Qualitätssicherung von bcl-2 cRNA Standard Strips

ZeptoStrips bei -20°C (leere Symbole) und Raumtemperatur (volle Symbole) gelagert



nte ..ional Application No PCT/DE 99/02715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) $IPC \ 7 \ C12Q$

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Category '	Change of document. With Modern		
Х	EP 0 726 310 A (GEN PROBE INC)	1-13	
	14 August 1996 (1996-08-14) see claims and examples		
X	STRATAGENE CATALOGUE, pages 274-277, XP002085450	1-13	
	the whole document		
X	DAY I N M ET AL: "Dried template DNA,	1-13	
	Dride PCR oligonucleotides and mailing in 96-well:LDL receptor gene mutation		
	screening" BIOTECHNIQUES, US, EATON PUBLISHING, NATICK,		
	vol. 18, no. 6, 1995, pages 981-984-984, XP002085449		
	ISSN: 0736-6205		
	the whole document		
	-/		
	•		

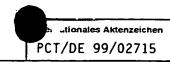
Further documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in annex.		
 Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the lart which is not considered to be of particular relevance 	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"E" earlier document but published on or after the international filling date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other, such document is combined with one or more other.		
"O" document referring to an oral disclosure, use. exhibition or other means	ments, such combined with the of the other sections and skilled in the art.		
**P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report		
9 March 2000	22/03/2000		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2	Authorized officer		
European Patent Office. P.B. 3316 Patential P.N 2280 HV Rijswijk NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Müller, F		

	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Relevant to claim No.
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	TOOTEN TO CHANT TO.
X	FR 2 674 253 A (DIAGNOSTICS PASTEUR) 25 September 1992 (1992-09-25) the whole document	1-13
X	SAMBROOK J. ET AL.,: "moleular cloning" 1987 , COLD SPRING HARBOUR PRESS, NEW YORK XP002132581 page 11.29 -page 11.30	1-3,12
Ρ,Χ	DE 197 16 154 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 22 October 1998 (1998-10-22) see the whole document, particulary the claims	1-13

onal Application No.
PCT/DE 99/02715

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0726310	A	14-08-1996	US 5556771 A AU 699590 B AU 4916796 A CA 2210584 A JP 10503383 T WO 9624664 A US 5614387 A US 5834254 A	17-09-1996 10-12-1998 27-08-1996 15-08-1996 31-03-1998 15-08-1996 25-03-1997 10-11-1998
FR 2674253	Α	25-09-1992	NONE	
DE 19716154	Α	22-10-1998	AU 7758598 A WO 9847490 A EP 0975335 A	13-11-1998 29-10-1998 02-02-2000

INTERNATION RECHERCHENBERICHT



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

14 4		T
Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 726 310 A (GEN PROBE INC) 14. August 1996 (1996-08-14) siehe Ansprüche und Beispiele	1-13
X	STRATAGENE CATALOGUE, Seiten 274-277, XP002085450 das ganze Dokument	1-13
X	DAY I N M ET AL: "Dried template DNA, Dride PCR oligonucleotides and mailing in 96-well:LDL receptor gene mutation screening" BIOTECHNIQUES,US,EATON PUBLISHING, NATICK, Bd. 18, Nr. 6, 1995, Seiten 981-984-984, XP002085449 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument	1-13

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie
Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum
"A" Veröftentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	Theorie angegeben ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer T\u00e4tigkeit beruhend betrachtet werden
anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werder soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erlindung kann nicht als auf erfinderischer T\u00e4tigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Ver\u00f6fentlichung mit einer oder mehreren anderen Ver\u00f6fentlichungen dieser K\u00e4tegorie in Ver\u00f6indung gebracht wird und diese Verbindung f\u00fcr einen Fachmann naheliegend ist "\u00e4" Ver\u00f6fentlichung, die Mitglied derselben Patentfamitie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
9. März 2000	22/03/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Müller, F

		PUI/UE 9	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
C.(Fortsetz	rung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie [:]	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erfordertich unter Angabe der in Betracht komme	enden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 674 253 A (DIAGNOSTICS PASTEUR) 25. September 1992 (1992-09-25) das ganze Dokument		1-13
X	SAMBROOK J. ET AL.,: "moleular cloning" 1987 , COLD SPRING HARBOUR PRESS, NEW YORK XP002132581 Seite 11.29 -Seite 11.30		1-3,12
P,X	DE 197 16 154 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) siehe ganzes Dokument, besond. Ansprüche		1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichur geweste zur selben Patentfamdie gehören

onales Aktenzeichen
PCT/DE 99/02715

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0726310	А	14-08-1996	US 5556771 A AU 699590 B AU 4916796 A CA 2210584 A JP 10503383 T W0 9624664 A US 5614387 A US 5834254 A	17-09-1996 10-12-1998 27-08-1996 15-08-1996 31-03-1998 15-08-1996 25-03-1997 10-11-1998
FR 2674253	Α	25-09-1992	KEINE	
DE 19716154	Α	22-10-1998	AU 7758598 A WO 9847490 A EP 0975335 A	13-11-1998 29-10-1998 02-02-2000